

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA**

**E. A. P. DE MEDICINA VETERINARIA**

**Determinación de leptina y sus valores séricos en  
alpacas hembras adultas con diferente condición  
corporal**

**TESIS**

para optar el título profesional de Médico Veterinario

**AUTOR**

Marco Alonso Enciso Hoyos

**Lima – Perú**

**2006**

A Dios, por permitirme llegar hasta aquí

A Carmen Rosa y Teodosio, mis padres, por todo lo que me han dado,  
y porque gracias a su esfuerzo he logrado convertirme en un profesional

A mi abuelo, José Ramos, ¡¡gracias por cuidarme desde el cielo!!

Al Dr. Willy, un maestro, un amigo, un segundo padre,  
y la Dra. Aida, por empujarme a terminar esta empresa

A Diana, por aparecer en el momento más difícil de mi vida,  
¡¡gracias por iluminar mi camino!!

A mis amigos verdaderos, los de siempre, los nuevos y los no tan nuevos,  
Pedro, Chuki, Totem, Mire, Beto, Nata, Marthita, Miri, Manuel, Lizbeth  
Lichi, Gian, Guille, Mustafá, Lena.... ¡¡gracias por la amistad!!

Muchas gracias a todo el personal del C.I.P Quimsachata,  
principalmente al Dr. Teo Huanca y al Dr. Oscar Cárdenas,  
muchas gracias también a los Dres. Mario Lino González y Rómulo Sapaná,  
gracias a todos Uds. por aguantarme desde la época de practicante

Un especial agradecimiento a la Dra. Raquel Pérez-Clariget,  
Por venir desde Uruguay a jalarme las orejas y ponerme en vereda,  
muchas gracias también al Dr. Santos Gama del C.I.N., Universidad de la República –  
Uruguay, por el procesamiento de las muestras

Muchas gracias también a mis asesores  
los Dres. Héctor Huamán y Alfonso Chavera

Un agradecimiento al Sub-Proyecto: “Aplicación de biotecnologías  
Reproductivas como herramienta para mejorar la productividad  
de alpacas y llamas” – INCAGRO – 2005-0015

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
Resumen.....	vi
Summary.....	vii
Lista de Cuadros.....	viii
Lista de Figuras.....	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Importancia de los camélidos sudamericanos.....	3
2.2. Breve revisión de la fisiología reproductiva en la alpaca.....	4
2.3. Interacción entre la reproducción y la nutrición.....	7
2.4. La leptina.....	9
2.4.1. Historia y generalidades.....	9
2.4.2. Receptores y acción sobre el eje central.....	12
2.4.3. Leptina y obesidad.....	14
2.4.4. Regulación de la reproducción.....	15
2.4.4.1. Papel de la leptina en la regulación de secreción de gonadotropinas.....	17
2.4.4.2. La leptina y el inicio de la pubertad.....	18
2.4.4.3. Efectos gonadales y embrionarios de la leptina.....	19
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1. Localización.....	21
3.2. Animales.....	21
3.3. Diseño experimental.....	22
3.3.1. Manejo de los animales.....	22

	Pág.
3.3.2. Determinación de la condición corporal.....	22
3.3.3. Toma de muestra.....	22
3.3.4. Determinación de leptina.....	23
3.3.5. Análisis estadístico.....	24
IV. RESULTADOS.....	25
V. DISCUSIÓN.....	27
VI. CONCLUSIONES.....	30
VII. RECOMENDACIONES.....	31
VIII. BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	32
IX. APÉNDICE.....	46

## LISTA DE CUADROS

	Pág.
<b>Cuadro 1.</b> Valores de concentración de leptina en las diferentes especies domésticas y el hombre.....	12
<b>Cuadro 2.</b> Valores séricos de leptina en alpacas con condición corporal (CC) < 3.0 y CC > 3.0.....	25
<b>Cuadro 3.</b> Valores séricos mínimos y máximos de leptina en G1 y G2.....	26

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Diagrama esquemático que ilustra la interacción entre la leptina y el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas y el endometrio.....	16
<b>Figura 2.</b> Distribución de las clases de concentración de leptina en G1 ( $CC < 3.0$ ) y G2 ( $CC > 3.0$ ).....	26



## RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la presencia de la hormona leptina en alpacas adultas, cuantificar sus valores y relacionarlos con la condición corporal. Con esta finalidad, se utilizaron 36 alpacas hembras adultas, vacías y sin cría, las cuales fueron divididas en dos grupos, según su condición corporal (CC): G1: CC < 3.0 y G2: CC > 3.0, de acuerdo a una escala 1 – 5 (1: emaciada, 5: obesa). Se tomaron muestras de sangre por punción de vena yugular para obtener suero y fueron mantenidas en congelación a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. La determinación de leptina fue realizada mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIA) específica para rumiantes. La media general de la concentración de leptina fue de  $17.23 \pm 0.81\text{ ng/ml}$ . Los valores encontrados para G1 fueron de  $18.14 \pm 1.12\text{ ng/ml}$  y para G2:  $16.32 \pm 1.15\text{ ng/ml}$ . Los resultados obtenidos permiten evidenciar la presencia de leptina en alpacas. La concentración de leptina no fue afectada por la categorización de los animales por condición corporal < 3.0 o > 3.0. Las hembras con condición corporal > 3.0 presentaron valores de concentración de leptina 10 % más bajos que las hembras con inferior condición corporal, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p = 0.2653$ ).

**Palabras claves:** Alpaca, leptina, condición corporal, radioinmunoensayo.

## SUMMARY

The aim of this study was to determine the presence of the leptin hormone in adult alpacas, in order to quantify leptin values for these animals, and to relate them with the body condition. For this purpose 36 non pregnant and non nursing female adult alpacas were used, and they were divided in two groups, according to their body condition (BC): G1: BC < 3.0 and G2: BC > 3.0, following to a scale 1 - 5 (1: emaciate, 5: obese). Blood samples by jugular venipuncture to obtain serum were taken. The samples of serum were maintained in freezing to -20 °C, until their analysis. The leptin determination was carried out by means of the radioimmunoassay technique (RIA) specific for ruminant. The mean of leptin concentration was  $17.23 \pm 0.81$  ng/ml. The values for G1 was  $18.14 \pm 1.12$  ng/ml and G2:  $16.32 \pm 1.15$  ng/ml. The obtained results shown the leptin hormone is also present in alpacas. The leptin concentration was not affected by body condition < 3.0 or > 3.0. The females with body condition > 3.0 presented values of leptin concentration 10 % lower than females with lesser body condition, but this difference was not statistically significant ( $p = 0.2653$ ).

**Keywords:** Alpaca, leptin, body condition, radioimmunoassay.

## I. INTRODUCCIÓN

La ganadería alpaquera constituye una actividad pecuaria de gran importancia económica para los pobladores de las zonas altoandinas del país (Fernández Baca, 1971). En la alpaca, la eficiencia reproductiva es un componente importante en su sistema productivo. Por ejemplo, el nacimiento de una cría anual por madre es crucial para maximizar la producción. Sin embargo, su nivel de productividad se ve drásticamente afectado por la baja eficiencia reproductiva que se presenta en dicho ambiente de crianza, la cual, expresada en tasa de natalidad, no es mayor al 50% (Novoa, 1991). En tal sentido, la identificación, estudio, y entendimiento de los factores que afectan la reproducción en alpacas son metas importantes para la sostenibilidad a largo plazo de la crianza alpaquera.

Entre esos factores, la nutrición es uno de los principales componentes que influye en la reproducción de los camélidos sudamericanos y demás rumiantes. Los nutrientes son distribuidos hacia todo el organismo para mantener la homeostasis siendo los nutrientes sobrantes los dirigidos para el crecimiento y reproducción (Wade *et al.*, 1996). Como existen demandas nutricionales para los tejidos y la síntesis y producción láctea, las funciones reproductivas son comprometidas si es que no se logra una compensación en la toma de nutrientes; por consiguiente, la pubertad y el reinicio de la actividad reproductiva post parto pueden tardarse (Butler, 2005).

Los mecanismos fisiológicos a través de los cuales la nutrición media sus efectos sobre la reproducción aún no han sido bien caracterizados. Una variedad de compuestos metabólicos, neurotransmisores y hormonas han sido implicados en la comunicación entre el estado nutricional y los centros que controlan la reproducción (Wade *et al.*,

1996). Evidencias sugieren que la leptina, una hormona proteica sintetizada principalmente por el tejido adiposo, juega un rol importante en esta red de comunicación (Friedman y Halaas, 1998). En ratones genéticamente deficientes en leptina, que son obesos e infértiles, el tratamiento con leptina indujo a una pérdida de peso y la restauración de la fertilidad (Barash *et al.*, 1996). Asimismo, observaciones hechas por Chilliard *et al.* (2005), indican que la leptina interviene significativamente en la regulación del eje reproductivo y en la disponibilidad y metabolismo de energía en los rumiantes domésticos.

En tal sentido, los objetivos del presente trabajo fueron determinar la presencia de la hormona leptina en alpacas adultas, cuantificar valores de leptina para estos animales, y relacionarlos con condición corporal, indicativo del estado nutricional.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Importancia de los camélidos sudamericanos

Las especies de la familia Camelidae están representadas por los camélidos del viejo mundo y los del nuevo mundo, también conocidos como Camélidos Sudamericanos; siendo estos últimos la Alpaca (*Vicugna pacos*), Llama (*Lama glama*), Vicuña (*Vicugna vicugna*) y Guanaco (*Lama guanicoe*). Los camélidos del viejo mundo son el Dromedario o camello de una joroba (*Camelus dromedarius*), y el Camello Bactriano o de dos jorobas (*Camelus bactrianus*) que habitan los desiertos de Asia y del África (Novoa, 1970).

La población total de camélidos sudamericanos se estima en aproximadamente 6.8 millones de individuos y se encuentran principalmente distribuidos en las zonas andinas de Argentina, Bolivia, Chile, Colombia, Ecuador, Paraguay y Perú (FIA, 2000). Históricamente y en especial la alpaca y la llama han tenido un importante rol en el desarrollo de la civilización asentada en las zonas andinas, inclusive desde antes del surgimiento del Imperio Incaico. Las alpacas sirvieron como una fuente importante de fibra y de carne, y las llamas como medio de transporte; situación que por lo general persiste en la actualidad. La crianza de estas especies es la fuente primaria de ingreso a las comunidades altoandinas de Perú, Chile y Bolivia. Se estima que alrededor de 500 mil familias campesinas de la región andina dependen directamente de la crianza de camélidos sudamericanos, además de otras que se benefician indirectamente de ella. (CONACS, 2006; Fernández Baca, 1971).

La fibra producida por la alpaca y la vicuña es muy apreciada por la industria textil a nivel mundial. En el caso de la alpaca su fibra suele tener en promedio un diámetro de 12 a 28  $\mu\text{m}$ , siendo más suave, fina y ligera que la de la llama, que presenta un diámetro promedio de entre 20 a 80  $\mu\text{m}$ . Sin embargo, la fibra más fina es aquella que es producida por las especies silvestres, como el guanaco y la vicuña, con diámetros de fibra que van de 16 a 18  $\mu\text{m}$  y 11 a 14  $\mu\text{m}$ , respectivamente (Wheeler, 1995).

En la actualidad, la producción mundial de fibra de alpaca excede los 4 millones de kg, lo que representa más US\$ 12 millones (FIA, 2000); siendo el Perú el que mayor población de alpacas posee en el mundo, con un estimado de más de 3 millones de cabezas, por lo que produce la mayor cantidad de fibra de alpaca. Ésta fibra es procesada por compañías textiles presentes en el Perú y en los Estados Unidos, para luego ser comercializada como prendas o tejidos a los diferentes países del mundo

La alta calidad y el alto valor que tiene la fibra de alpaca, sumado al interés de diversas industrias textiles presentes en algunos países desarrollados ha conllevado a que en la década de los '90 (1989 – 1998) se exportara al exterior y de manera desenfrenada un gran número de animales de alto valor genético, desde el Perú y a través de Chile, hacia Estados Unidos, Nueva Zelanda, Australia, Inglaterra, y Canadá (FIA, 2000).

## **2.2. Breve revisión de la fisiología reproductiva en la alpaca**

Al analizar el rendimiento reproductivo de la alpaca es importante revisar los componentes que están involucrados. La reproducción es un fenómeno fisiológico muy complejo que presenta algunas particularidades que son necesarias revisar.

Las alpacas y llamas son clasificadas como especies de ovulación inducida, porque el reflejo de ovulación tendrá lugar después del estímulo copulatorio (Fernández Baca *et al.*, 1970a; San Martín *et al.*, 1968). En ausencia de macho, las alpacas hembras pueden permanecer en estro hasta más de 36 días, con periodos ocasionales de anestro que no suelen durar más de 48 horas (San Martín *et al.*, 1968).

Las alpacas no tienen ciclos sexuales definidos como ocurre en otras especies (por ej. vaca, oveja); más bien se ha demostrado que presentan ciclos de actividad folicular que

duran alrededor de 12 a 16 días, durante los cuales sólo uno de varios folículos emergentes continúa su desarrollo (Vaughan *et al.*, 2004; San Martín *et al.*, 1968).

Al no tener un ciclo estral, los términos fase folicular y fase luteal son los más convenientes para caracterizar el ciclo sexual. La conducta sexual puede ser considerada en dos únicos modelos, es decir, el receptividad y el de no receptividad de la hembra.

La edad exacta en la que las alpacas alcanzan la pubertad no se define claramente. Es una práctica generalizada el iniciar la reproducción de las hembras a los 2 a 3 años de edad (Novoa, 1991), considerando que normalmente las alpacas entran en actividad reproductiva cuando alcanzan aproximadamente el 60% del peso de un adulto (Sumar, 2002). Sin embargo, el reporte de Novoa *et al.* (1972) indica que las alpacas son sexualmente receptivas y capaces de ovular a partir de los 12 meses de edad, siendo los índices de ovulación, fertilización y desarrollo embrionario de alpacas de un año similares a los de alpacas adultas.

Bajo condiciones normales, las hembras sexualmente receptivas, en presencia de un macho sexualmente maduro se echan sobre su vientre, en posición copulatoria y aceptan la monta (Novoa y Leyva, 1996). También existen hembras que estando receptivas no aceptan la monta (San Martín *et al.*, 1968). La receptividad sexual no está siempre asociada a con la presencia de un folículo dominante (Bravo *et al.*, 1994, Sumar *et al.*, 1993). La presencia de un macho dominante agresivo puede llevar a hembras no-receptivas a adoptar la postura de cópula (Adams, 1997). Por otro lado, la conducta sexual en hembras no-receptivas está correlacionada con la presencia de un cuerpo lúteo. Las hembras no-receptivas tratan de escapar del macho, pateando, gritando y escupiendo (Novoa y Leyva, 1996).

El patrón reproductivo de los camélidos sudamericanos está influenciado por las condiciones medio ambientales y al manejo al que son sometidos. El período reproductivo de las alpacas y llamas que habitan la zona andina de Perú, Bolivia y Argentina tiene lugar entre los meses de diciembre a marzo, en los cuales la disponibilidad de alimento a base de pasturas naturales, es la más alta (Sumar, 1996; Fernández Baca, 1993). En el hemisferio norte, las alpacas y llamas se reproducen durante todo el año (Schmidt, 1973), asimismo, en Nueva Zelanda, las alpacas se reproducen por igual en los meses de primavera y otoño (Pollard *et al.*, 1995); la proporción de preñez observada en hembras servidas en primavera no difirió de aquellas

servidas en otoño (Knigth *et al.*, 1995). Sin embargo, el reporte de Pollard *et al.* (1995) sugiere que hembras y machos muestran un menor interés sexual durante los meses de primavera.

Las alpacas tienen un modelo de desarrollo folicular a manera de ondas (Vaughan *et al.*, 2004; Bravo y Sumar, 1989). El modelo de ondas foliculares se apoya en el aumento periódico en el número de folículos, y la emergencia de un folículo dominante que puede alcanzar un diámetro de 7 mm (Vaughan *et al.*, 2004). Se ha propuesto que la ovulación en respuesta al estímulo de la monta es influenciada por el estado de desarrollo del folículo dominante en el momento de la cópula (Vaughan *et al.*, 2004, Bravo *et al.*, 1991). Los folículos dominantes de más de 6 mm son capaces de ovular, y folículos más pequeños o aquellos que están sufriendo regresión no son capaces de hacerlo (Bravo *et al.*, 1991).

La fase luteal que sigue a la inducción natural de ovulación ha sido bien descrita (Novoa y Leyva, 1996; Sumar, 1996). El tamaño máximo de cuerpo lúteo (CL) y la máxima concentración de progesterona plasmática ocurre en el día 8 post cópula (día 0 = cópula). La disminución del diámetro del CL y del perfil de progesterona plasmática, durante la luteólisis en hembras no preñadas ocurre alrededor del día 10 a 11 post cópula. El útero controla la regresión del CL en la alpaca no preñada (Fernández Baca *et al.*, 1979). La histerectomía parcial prolonga la vida del cuerpo lúteo ipsilateral al cuerno uterino extraído. Además, el cuerno uterino derecho parece tener un efecto luteolítico local, mientras que el cuerno izquierdo tiene un efecto luteolítico local y sistémico (Fernández Baca *et al.*, 1979). El estudio de Del Campo *et al.* (1996) sugiere que el cuerno izquierdo puede inducir luteólisis del CL en el ovario derecho vía un mecanismo venoso-arterial local. La luteólisis ha sido asociada con una descarga pulsátil de prostaglandina (PGF<sub>2α</sub>) del útero alrededor de 9 a 12 días después la cópula (Novoa y Leyva, 1996).

Si ocurre concepción luego de la monta, el CL se mantiene durante toda la preñez (Sumar, 2002). La gestación en alpacas dura de 325 a 361 días (San Martín *et al.*, 1968). Aunque existe una alta proporción de fertilización (70 % a 80 %) se sabe que después de la monta natural, se pierden del 25 % al 50 % de embriones durante los primeros 30 días de gestación (Knigth *et al.*, 1995; Fernández Baca *et al.*, 1970b). Se desconoce si la alta pérdida embrionaria se debe a un defecto intrínseco de los gametos, o a eventos y/o



alteraciones dentro del ambiente uterino. La migración del embrión del cuerno uterino derecho al izquierdo es común y al parecer es algo propio de la especie. Aproximadamente el 98% de las gestaciones se llevan a cabo en el cuerno izquierdo, sin tener en cuenta el sitio de ovulación (Sumar, 1997; Fernández Baca *et al.*, 1973), esto sugiere que el desarrollo del embrión en el cuerno derecho puede estar comprometido.

Con respecto al desarrollo fetal en la alpaca, se ha demostrado que a partir del séptimo mes de gestación (aproximadamente 210 días) el crecimiento es exponencial, de tal manera que el 70 % del peso de la cría al nacimiento ocurre en este período. En la puna, este período crítico coincide con una pobre disponibilidad de alimento, que puede repercutir en bajos pesos al nacimiento y pobre supervivencia de las crías (Novoa y Leyva, 1996).

### **2.3. Interacción entre la reproducción y la nutrición**

La relación entre la reproducción y nutrición de rumiantes es compleja. La actividad reproductiva de la hembra está condicionada por el nivel de alimentación que recibe para alcanzar la pubertad, entre la pubertad y el primer servicio, y a lo largo de su vida productiva; es así que la condición corporal, el nivel de alimentación y el estado fisiológico (lactación, gestación) pueden influir sobre la eficacia del sistema reproductivo (Araujo, 2002).

No se conoce información referente a la interacción reproducción – nutrición en CSA. Sólo se puede relacionar la información de los eventos productivos, aquellos que integran la reproducción de hembras y machos (producción de gametos, cópula oportuna, fertilización, implante y gestación, parto y lactación), con la disponibilidad y calidad de forraje en el medio natural de crianza (San Martín, 1996). Al evaluar las diferentes fases productivas de la crianza de alpacas y la estacionalidad de la disponibilidad y calidad de pasturas durante el año, es posible identificar algunas etapas en las cuales los requerimientos nutricionales no son cubiertos. Estas etapas son el destete, que se realiza entre los meses de setiembre y octubre, y el último tercio de gestación, que se produce entre los meses de setiembre a diciembre (San Martín, 1996).

La información general sobre requerimientos nutricionales en alpacas es bastante reducida. Sólo se reporta un trabajo para la estimación de los requerimientos energéticos para mantenimiento (Flores *et al.*, 1989), y uno para los requerimientos de proteína (Huasasquiche, 1974); por lo tanto los estudios en este campo son muy limitados y se requiere mayor investigación al respecto.

En otras especies de rumiantes domésticos se han realizado numerosos estudios sobre la influencia de la alimentación en la reproducción; éstos señalan distintos factores que pueden influir a nivel del hipotálamo y la pituitaria (secreción de GnRH, LH y FSH) (Susin *et al.*, 1995; Adam y Robinson, 1994), el ovario (calidad de los ovocitos, producción de esteroides y concentraciones de IGF-1) y sobre las consecuencias de éstas señales endocrinas en el útero (Lucy *et al.*, 1992).

La influencia de la nutrición sobre la actividad sexual y fertilidad depende del estado de carnes o condición corporal de los animales. En diferentes especies domésticas, como los bovinos, se ha venido empleando el índice de condición corporal como parámetro indicador estado nutricional de los animales. Butler (2005) menciona que bovinos con una pérdida de condición corporal mayor al 20 % después del parto, tienden a extender el intervalo de reinicio de actividad ovárica post parto y por lo tanto el intervalo parto-concepción. En el caso de los ovinos, la capacidad de la nutrición para alterar la tasa de ovulación se conoce desde hace tiempo. Una rápida mejora de la condición corporal a través de la suplementación con concentrados energéticos o proteicos en el periodo inmediatamente anterior a la cubrición (flushing) está asociada a un incremento de la tasa de ovulación y del porcentaje de partos múltiples (Martin y Walkden-Brown, 1995). Sin embargo, se ha podido comprobar, que existe un peso vivo y una condición corporal determinada por encima de las cuales las mejoras en la alimentación no se traducen en un aumento de la fertilidad (Robinson, 1990).

Se sabe que de la cantidad de tejido adiposo que tiene un animal depende de la regulación de la ingestión alimenticia y de la actividad reproductiva, pero el medio por el cual los animales son capaces de estimar su propio contenido en lípidos corporales no se ha conocido hasta hace poco. La leptina, una hormona recientemente identificada, parece jugar un papel importante en la relación que existe entre la cantidad de reservas adiposas y la reproducción (Houseknecht, *et al.*, 1998).

## **2.4. La leptina**

### **2.4.1. Historia y generalidades**

La leptina fue descubierta en año 1994 y fue considerada como la hormona de la “anti-obesidad” (Zhang *et al.*, 1994). Por primera vez en la historia, la simple administración de una proteína a un ratón genéticamente obeso, redujo la cantidad de grasa y masa corporal y aumentó los niveles de energía (Campfield *et al.*, 1995; Halaas *et al.*, 1995; Pelleymounter *et al.*, 1995). La expectativa de la implicancia que tendría para las aplicaciones humanas fue enorme. Sin embargo, en los años siguientes, se encontró que la deficiencia congénita de leptina en humanos probablemente no era una causa de obesidad como si lo era en algunas personas deficientes de leptina. Por ese motivo, el enfoque de la investigación cambió a la búsqueda de la resistencia de leptina adquirida como un factor que contribuye en la epidemia de obesidad actual. Adicionalmente, como los mecanismos de acción de la leptina se están elucidando, se ha comprobado que la presencia de ésta hormona es más ubicua de lo que se pensó originalmente. Hoy, la investigación no sólo ha implicado a la leptina en el control del metabolismo de energía, sino también en los procesos de crecimiento, reproducción, función inmune y osteogénesis (Bruce, 2004).

La leptina es una proteína de 16 kDa producida por el gen de la obesidad (*ob*). Es similar en estructura y señalización a una citoquina, está formada por 167 aminoácidos colocados en cuatro hélices alfa (Margetic *et al.*, 2002; Friedman y Halaas, 1998). El nombre de la leptina proviene del griego *leptos*, que significa “delgado” (Friedman y Halaas, 1998).

Los primeros experimentos que sugirieron la existencia de esta proteína se realizaron en los años 70's por Coleman (1973), mediante el ensayo de parabiosis con dos modelos de obesidad genética en el ratón: el ratón *ob/ob* (ratón obeso) y el ratón *db/db* (ratón diabético), y con ratones normales. La parabiosis con los diferentes modelos de ratones tuvo los siguientes resultados: a) la llegada de productos de la circulación sanguínea procedente del ratón *db/db* al ratón *ob/ob*, o al ratón normal, causaba la muerte de ambos por inanición, b) la parabiosis entre el ratón *db/db* con otro ratón *db/db* no

producía ningún cambio en el ratón receptor, y c) la conexión del ratón normal con el ratón *ob/ob*, producía en éste una disminución del peso corporal por disminución de la ingesta. Por tanto, el ratón *ob/ob* era deficitario para el producto del gen *ob*, que poseía tanto el ratón normal como el ratón *db/db*. El ratón *db/db* lo tendría en exceso y sería resistente a la acción del mismo. El producto del gen *ob* sería un factor de saciedad que regularía la ingesta en el ratón (Coleman, 1973; Coleman y Hummel, 1973).

En 1994, Zhang *et al.*, lograron la clonación del gen *ob* e identificaron a su producto como leptina. En 1995, Halaas *et al.*, administraron leptina a los diferentes modelos de obesidad en el ratón y comprobaron que en el ratón *ob/ob* había una disminución de peso, por el descenso del porcentaje de grasa corporal, por reducción de la ingesta y por una aumento del gasto energético. El ratón obeso y el ratón normal tenían una respuesta similar, pero menos intensa; y el ratón *db/db* no presentaba ningún cambio, esto apoyaba la teoría de que el gen *db* podría ser el codificador del receptor de la leptina, y de esta manera se explicaría la resistencia a la leptina que se da en este tipo de ratón. La administración de leptina intracerebral a nivel del ventrículo lateral del cerebro en ratones *db/db* tampoco tenía ningún efecto, quizás porque el defecto se daba a nivel del receptor de la leptina en la transmisión de la señal post receptor (Campfield *et al.*, 1995).

Aunque se ha aislado el ARNm de leptina de diversos lugares como cerebro, hipotálamo, glándula pituitaria (Morash *et al.*, 1999; Wiesner *et al.*, 1999), músculo esquelético (Wang *et al.*, 1998), epitelio del estómago (Bado *et al.*, 1998), placenta (Hoggard, *et al.*, 1997), ovarios, glándula mamaria y hueso (Margetic *et al.*, 2002; Moschos *et al.*, 2002), la mayor producción de ésta hormona ocurre en el tejido adiposo (Houseknecht *et al.*, 1998). Las concentraciones plasmáticas de leptina reflejan la cantidad de tejido adiposo en el cuerpo y tienden a aumentar y disminuir con ganancia y pérdida de peso, respectivamente. En animales normales, la leptina actúa como una señal aferente al sistema nervioso central (SNC) indicando que el cuerpo está en equilibrio energético positivo o negativo. Esto causa un cambio apropiado en el apetito, como una forma de corregir el desequilibrio y mantener peso corporal. Sin embargo los ratones deficientes de leptina (*ob/ob*) son hiperfágicos y masivamente obesos, debido a su incapacidad para regular el apetito. Estas patologías pueden ser corregidas por

administración de leptina exógena (Campfield *et al.*, 1995; Halaas *et al.*, 1995; Pellemounter *et al.*, 1995).

Las concentraciones plasmáticas de leptina dependen mucho más que simplemente de la masa adiposa. Las hembras tienden a presentar valores más altos de leptina plasmática que los machos, y en los animales más viejos las concentraciones son más altas que en los más jóvenes, independiente de adiposidad (Buff *et al.*, 2002; Montague *et al.*, 1997). En humanos, la grasa subcutánea produce mucho más leptina que la grasa del omento, aunque se ha encontrado lo opuesto en roedores (Hube *et al.*, 1996). También se ha observado que las dietas altas en carbohidratos aumentan el nivel de leptina plasmática a un grado mayor que las dietas altas en grasa (Dirlewanger *et al.*, 2000) y adicionado al intervalo entre comidas, podrían influir en el ritmo circadiano en humanos (Elimam y Marcus, 2002), aunque esto no se ha probado en animales.

En ratones normales, humanos, ovinos (Delavaud *et al.*, 2000), ganado bovino adulto (Ehrhardt *et al.*, 2000) y vaquillas en desarrollo (García *et al.*, 2002b), se observa una correlación positiva entre las concentraciones circulantes de leptina y la adiposidad y aumento de peso corporal. El tratamiento exógeno con leptina redujo el consumo de alimento en varias especies tales como ratones (van Heek *et al.*, 1997), porcinos (Barb *et al.*, 1998) y ovinos (Henry *et al.*, 1999).

Cuando el ARNm de la leptina empezó a ser identificado en otros lugares diferentes al tejido adiposo, los investigadores buscaron otros posibles roles de la leptina en el metabolismo. La evidencia acumulada demostró la estrecha relación de la leptina con la secreción de insulina, hematopoyesis, producción de tiroxina, función cardiovascular, equilibrio de fluidos, y fertilidad, entre otros (Margetic *et al.*, 2002). Al parecer no hay ningún sistema fisiológico que no esté bajo el mando de la leptina de alguna forma. Este aspecto de la investigación sobre la leptina ha llevado a la hipótesis de que leptina es mucho más que un signo de saciedad, es, de hecho, una “hormona maestra,” comunicando información sobre la disponibilidad de energía entre el SNC y el periférico, y actuando como un factor permisivo para los procesos energéticos intensivos como el crecimiento, la reproducción, y el inicio de la respuesta inmune (Bruce, 2004).

Se han realizado numerosos estudios de cuantificación de la leptina en el hombre y en diferentes especies domésticas. A continuación se presenta una revisión de los valores de leptina en los animales domésticos y el hombre (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Valores de concentración de leptina en las diferentes especies domésticas y el hombre.**

Especie	Valores promedio	Referencias
Oveja	6 – 10 ng/ml	Delavaud <i>et al.</i> (2000), Daniel <i>et al.</i> (2002), Tokuda <i>et al.</i> (2003)
Vaca	2 – 6 ng/ml	Ehrhardt <i>et al.</i> (2000), Ciccioli <i>et al.</i> (2003), Strauch <i>et al.</i> (2003)
Cabra	3 – 12 ng/ml	Bonnet <i>et al.</i> (2004)
Caballo	3 – 5 ng/ml	Buff <i>et al.</i> (2002), Gentry <i>et al.</i> (2002)
Cerdo	2 – 3 ng/ml	Qian <i>et al.</i> (1999), Barb <i>et al.</i> (2001)
Ratón	8 – 10 ng/ml	Correia <i>et al.</i> (2002)
Rata	2 – 10 ng/ml	Mooradian <i>et al.</i> (2000)
Pollo	1 – 3 ng/ml	Dridi <i>et al.</i> (2000)
Humano	2 – 18 ng/ml	Cabrera (2000), Chow y Phoon (2003)

#### 2.4.2. Receptores y acción sobre el eje central

Las regiones del cerebro en las que el ARNm de la leptina ha sido detectado son la corteza cerebral, cerebelo, hipotálamo, y la glándula pineal, sin embargo, no está claro si las neuronas son la fuente de leptina en el sistema nervioso central. Se descubrió el ARNm y proteína de leptina en una línea de células de glia (células de glioblastoma) de rata (Morash *et al.*, 1999), sugiriendo que la síntesis de leptina dentro del cerebro puede venir de otras células diferentes a las neuronas.

Los efectos celulares de la leptina parecen ser mediados vía la activación del receptor de leptina (RL), un miembro de la familia de receptores de citoquinas (Tartaglia, 1997). Se han identificado seis isoformas del RL (Tartaglia, 1997), pero sólo la forma larga parece ser totalmente capaz de la transducción de la señal (Bjørnbæk *et al.*, 1997). La ocurrencia de la forma larga del RL ha sido reportada en varios tejidos, incluyendo el cerebro, adenohipófisis, pulmón, riñón, hígado, tejido adiposo, páncreas y músculo (Amstalden, 2003). El RL es abundante en el hipotálamo, sobre todo en el hipotálamo ventromedial y en el núcleo arcuato (Houseknecht y Portocarrero, 1998); además, se ha comprobado el aumento de la expresión de la forma larga del RL en el hipotálamo de ovejas con alimentación restringida (Dyer *et al.*, 1997).

El RL ha sido detectado en células GT1-7, una línea celular secretora de GnRH (Magni *et al.*, 1999). El tratamiento con leptina estimuló la secreción de GnRH en estas células; sin embargo, las neuronas de GnRH parecen no expresar el RL (Finn *et al.*, 1998). Por consiguiente, es probable que los efectos de la leptina en la regulación de la descarga hipotalámica de GnRH sean indirectos, vía la interacción con otros sistemas neuronales. No obstante, la leptina aumentó la secreción de GnRH en explantes de hipotálamo de rata (Yu *et al.*, 1997; Woller *et al.*, 2001) y cerdo (Barb, 1999).

La leptina también afecta el eje hipotalámico-gonadotrópico de forma directa, a nivel de la adenohipófisis. En un experimento con explantes de adenohipófisis de rata, aumentó la secreción de LH (Yu *et al.*, 1997); sin embargo, a dosis muy altas, la leptina pierde su habilidad de estimular la descarga de LH y GnRH en explantes de adenohipófisis e hipotálamo, respectivamente (Yu *et al.*, 1997). Por otra parte, el RL fue colocado en células gonadotrópicas de ovinos (Iqbal *et al.*, 2000), demostrando que la leptina puede actuar de la misma manera en el hipotálamo y adenohipófisis, para influir en la secreción de gonadotropinas.

Existe evidencia que los efectos de la leptina sobre el SNC son mediados en parte, vía las neuronas secretoras de Neuropéptido-Y (NPY). El ARNm del RL ha sido descubierto en neuronas de NPY (Finn *et al.*, 1998). La expresión del NPY en el hipotálamo aumenta en ratones *ob/ob*, y el tratamiento con leptina disminuye el NPY hipotalámico en este ratón mutante (Stephens *et al.*, 1995). Una correlación interesante es que la restricción de alimento aumenta el ARNm del NPY en ovinos (McShane *et al.*, 1993), y la infusión intracerebroventricular (ICV) de NPY disminuyó las

concentraciones circulantes de LH en ovinos (McShane *et al.*, 1992) y bovinos (Gazal *et al.*, 1998). Además, la infusión ICV de leptina previno el consumo de alimento en ratas NPY-inducidas (Sahu, 1998). Sin embargo, en vacas ovariectomizadas y con implantes de estradiol, el pre-tratamiento con leptina no previno del descenso en las concentraciones plasmáticas de LH mediadas por el NPY (Garcia *et al.*, 2002a). La leptina previene el aumento de NPY en el ARNm de ratas bajo ayuno, y el aumento modesto en las concentraciones de leptina por administración hipodérmica disminuyeron el ARNm del NPY en el núcleo arcuato (Schwartz *et al.*, 1996).

Se especula que sistemas neuronales adicionales podrían estar involucrados en mediar los efectos centrales de la leptina. Se ha informado que neuronas que expresan GABA (Ovesjö *et al.*, 2001), AgRP (Wilson *et al.*, 1999), galanina y orexina (Iqbal *et al.*, 2001), contienen RL y se sugiere que esas neuronas son blancos directos para la leptina.

### **2.4.3. Leptina y obesidad**

Se han realizado varios estudios en diferentes modelos de ratón y ratas para observar la relación entre leptina y obesidad, a nivel de mecanismos de acción, las respuestas que provoca y también si existen factores genéticos implicados en ello.

Con el fin de estudiar la fisiopatología de la leptina se han estudiado ratas con lesión a nivel del hipotálamo ventromedial, a las cuales se les ha administrado leptina. Tras la lesión hipotalámica, desarrollaron obesidad y la administración intracerebral de leptina no dio lugar a una disminución de la ingesta y del peso corporal, como en los controles (Sato *et al.*, 1997).

La administración de leptina sistémica activa el subnúcleo parabraquial lateral superior (neuronas con colecistoquinina). Es un potencial mecanismo para la termogénesis, incluyendo la mediación por el tejido adiposo amarillo, motilidad gastrointestinal, la tasa metabólica y el estado cardiovascular. Estos datos apoyan la hipótesis que la leptina puede actuar vía hipotálamo ventrobasal en un número de circuitos paralelos relacionados con el sistema hormonal corporal que regula el metabolismo energético (Elmqvist *et al.*, 1997).



Las neuronas POMC en el hipotálamo expresan el receptor del ARN-m de la leptina, éstas neuronas y el gen POMC forman parte de la vía que media la acción de la leptina en la ingesta y quizás en otras funciones fisiológicas (Cheung *et al.*, 1997a).

La proopiomelanocortina forma parte de la unión entre leptina y los mecanismos fisiológicos que controlan el peso corporal y la reproducción. Las melanocortinas, derivadas de POMC, están implicadas en la regulación del peso corporal. El ARN-m de la POMC disminuye en el núcleo arcuato del ratón *ob/ob*, y se normaliza al administrar leptina (Thornton *et al.*, 1997).

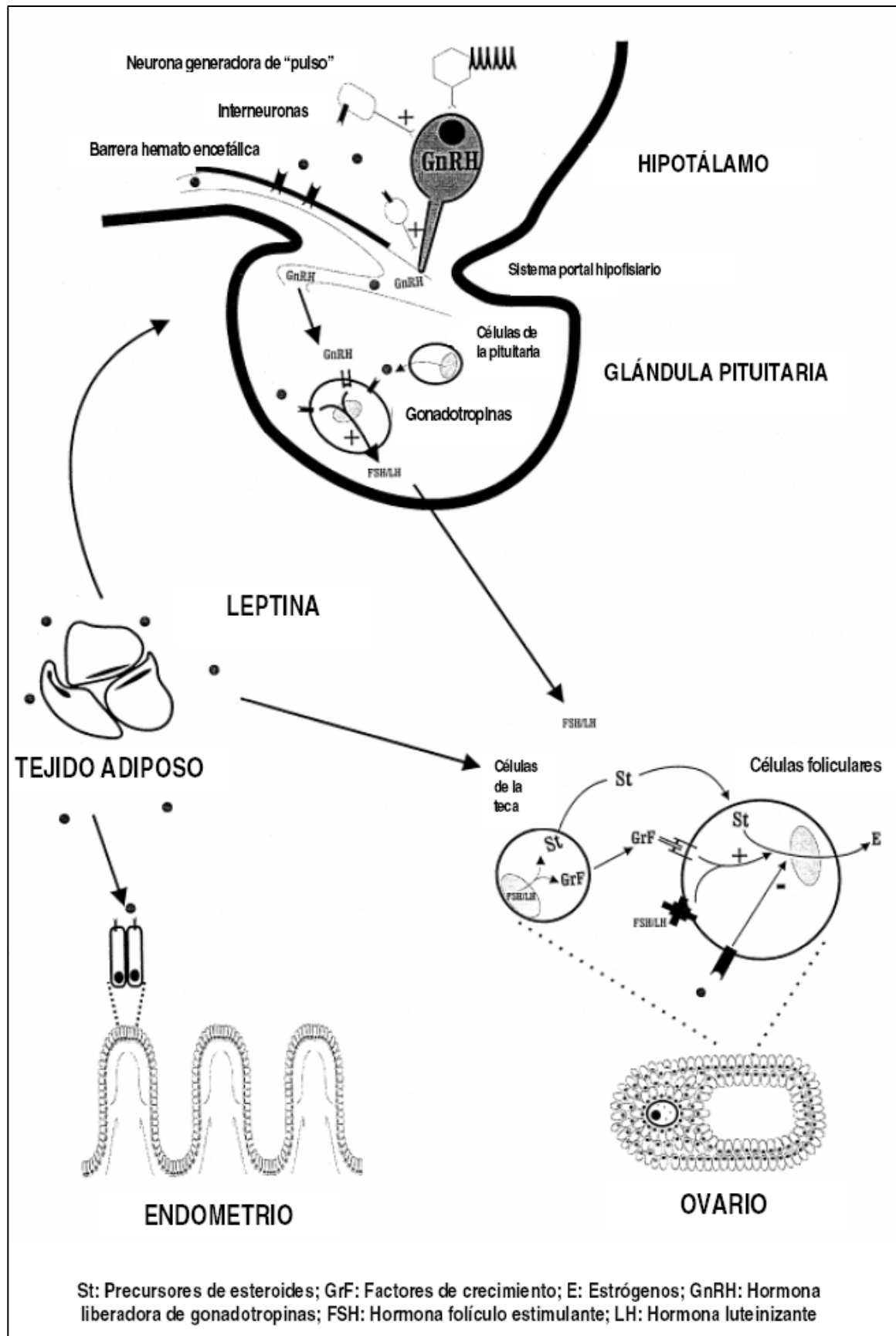
#### **2.4.4. Regulación de la reproducción**

Los ratones *ob/ob* son infértiles y tienen los órganos reproductores atrofiados (Barash *et al.*, 1996). La secreción de gonadotropinas es limitada y el eje reproductivo central es muy sensible a la retroalimentación negativa de esteroides gonadales. El tratamiento con leptina rejuvenece el sistema reproductivo de estos ratones, lo cual lleva al crecimiento y funcionamiento de los órganos reproductivos además de la fertilidad a través de la secreción de gonadotropinas.

La leptina también induce a una pérdida de peso, restaurando la reproducción en machos (Mounzih *et al.*, 1997) y hembras (Barash *et al.*, 1996). En ratones prepúberes normales, el tratamiento con leptina indujo a un inicio temprano del ciclo estral (Ahima *et al.*, 1997; Chehab *et al.*, 1997).

La condición nutricional y la maduración sexual son importantes en la manera en la que la leptina afecta el eje hipotalámico-hipofisiario. En la Figura 1 se esquematiza la interacción entre el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas y el endometrio.

**Figura 1. Diagrama esquemático que ilustra la interacción entre la leptina y el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas y el endometrio. Fuente: Adaptado de Moschos *et al.* (2002).**



#### **2.4.4.1. Papel de la leptina en la regulación de secreción de gonadotropinas**

Los rumiantes, como bovinos y ovinos, presentan una respuesta menos aguda a cambios en la ingesta de energía por períodos cortos que los monogástricos. Sin embargo, vaquillonas prepúberes (Amstalden *et al.*, 2000) y carneros castrados implantados con estradiol (Nagatani *et al.*, 2000), representan dos modelos en los cuales el ayuno agudo ha demostrado restringir la frecuencia de los pulsos de LH y disminuir la media de concentraciones de LH circulantes en rumiantes. Por este motivo, ambos modelos animales han sido utilizados para estudiar el papel de la leptina en la regulación del eje hipotalámico-hipofisiario. El tratamiento con leptina no afecta a la secreción de LH en ovejas y vacas ovariectomizadas con buena nutrición pero resulta claro que evita la reducción de la frecuencia de los pulsos de LH en carneros castrados tratados con estradiol y vaquillonas prepúberes intactas en ayuno (Zieba *et al.*, 2004).

En un inicio, la leptina parecía estimular la secreción de LH en ovejas ovariectomizadas con dieta restringida de manera permanente, sin embargo, en estudios más recientes, se sugiere que sólo las ovejas en ayuno que antes habían recibido una dieta normal presentarán una respuesta aguda a la leptina mientras que, ovejas con una restricción de nutrientes durante un período largo seguido de un período de ayuno, no responden con un aumento de la secreción de LH debido a una adaptación metabólica (Nagatani *et al.*, 2000).

En vacas adultas, a pesar de que un ayuno por período corto (2-3 días) no puede restringir la frecuencia de los pulsos de LH, incluso en animales delgados, la leptina estimula un importante aumento de las concentraciones basales y medias generales de LH. Éste es el resultado de un aumento del tamaño de pulsos de LH (Amstalden *et al.*, 2002; Maciel *et al.*, 2004; Zieba *et al.*, 2004).

Investigaciones utilizando explantes de la pituitaria anterior, coinciden con la postura de que los efectos de la leptina en la secreción de LH en hembras rumiantes que han alcanzado la madurez sexual residen en gran medida a nivel de la pituitaria anterior. Sin embargo, en mediciones de GnRH hechas directamente en el líquido cefalorraquídeo (LCR) recolectado del tercer ventrículo (IIIV), se observó la capacidad de la leptina de aumentar el tamaño de los pulsos y las concentraciones de GnRH en el IIIIV del LCR de vacas en ayuno (Zieba *et al.*, 2004). Por lo tanto, resulta claro que la leptina estimula la

secreción de LH en la vaca, actuando en el hipotálamo y en la pituitaria anterior (Amstalden *et al.*, 2002; Zieba *et al.*, 2004).

No se ha comprendido la incapacidad de la leptina de estimular un aumento de las concentraciones circulantes de LH en bovinos y ovinos bien alimentados y en explantes o cultivos de células primarias de bovinos bien alimentados. Sin embargo, el trabajo realizado por Zieba *et al.* (2003) nos sugiere que la leptina estimula el eje reproductivo central, principalmente en animales en condiciones de estrés nutricional. Además, los efectos de la leptina parecen estar estrechamente relacionados con la dosis utilizada. Leptina recombinante ovina, inyectada de forma intravenosa provoca un aumento inverso relacionado con la dosis en las concentraciones basales de LH en vacas después de un ayuno de 60 hrs. Una dosis de 0.2 µg/Kg. maximizó el aumento de LH, mientras que las dosis de 2 y 20 µg/Kg. tuvieron menor respuesta o no tuvieron respuesta, respectivamente. Por tanto, la duración y/o la cantidad de exposición a la hormona parecen determinar el nivel de resistencia (Zieba *et al.*, 2003).

#### **2.4.4.2. La leptina y el inicio de la pubertad**

El inicio de la pubertad está caracterizado por una aceleración en la actividad generadora de pulsos de GnRH con lo cual aumenta la liberación pulsátil de LH. Varios estudios han demostrado un avance en el comienzo de la pubertad en ratones hembras tratadas con leptina y, por inferencia directa, un aumento en la secreción de GnRH y LH. Cheung *et al.* (2001) realizaron una reevaluación del papel de la leptina en la maduración sexual en ratas y ratones. Concluyeron que la leptina es uno de varios factores cuya presencia es necesaria pero no suficiente por si sola para iniciar la maduración sexual en roedores.

En un análisis del patrón de expresión del ARNm en el tejido adiposo para concentraciones de leptina y concentraciones séricas de leptina durante el desarrollo puberal en vaquillonas correlacionados con el peso corporal y la adiposidad, proporciones de leptina unida/libre y concentraciones séricas de IGF-1 se encontró que la mayor variación asociada con el momento de comienzo de la pubertad se debió al peso corporal que estuvo alternante correlacionado con la leptina circulante. Las

concentraciones séricas de leptina, IGF-1 y la expresión de los genes de leptina aumentó con la llegada de la pubertad en vaquillonas que alcanzaron la madurez sexual entre el comienzo de la primavera y mediados del verano. El aumento de la leptina en suero fue lineal, independientemente de la estación en la cual comenzó la pubertad (García *et al.*, 2002b).

A pesar de que los primeros informes indicaban que la leptina podía disparar la transición puberal en roedores (Cheung *et al.*, 1997b; Chehab *et al.*, 1997), no se ha encontrado evidencia que apoye esta hipótesis. En el estudio hecho por García *et al.* (2002b) no fue posible acelerar el desarrollo de un patrón de secreción de gonadotropinas de animales sexualmente maduros, ni con el tratamiento crónico de vaquillonas alimentadas normalmente, ni con tratamientos agudos a vaquillonas de crecimiento normal o restringido.

Otros estudios buscaron manipular las concentraciones séricas de leptina y, de ese modo, el control del momento de la pubertad durante el crecimiento y desarrollo. García *et al.* (2003) intentaron reducir el grado de aumento de tejido adiposo durante el desarrollo puberal. Esto se realizó a través de una dieta con altos contenidos de ácido linoleico conjugado (ALC) en los tejidos, el cual en teoría puede suprimir la conversión de células precursoras en adipositos. Es posible aumentar varias veces los contenidos de ALC tanto en el rumen como en la leche utilizando este enfoque debido a que el ALC es un producto intermedio de la biohidrogenación del ácido linoleico en el rumen. A pesar que fue logrado un aumento del contenido de ALC en el tejido administrando esta dieta a vaquillonas entre 4 meses de edad y la pubertad, no fue posible reducir la adiposidad ni las concentraciones circulantes de leptina, ni se pudo modificar la edad de la pubertad.

#### **2.4.4.3. Efectos gonadales y embrionarios de la leptina**

La leptina, no sólo participa en el control de la secreción de gonadotropinas a través de sus acciones sobre el eje hipotálamo/hipofisiario, sino que la leptina circulante o producida en forma local también puede brindar modulación directa de la función

ovárica y testicular. Las células tecaes y de la granulosa del ovario poseen receptores de gran afinidad para la leptina (González *et al.*, 2000).

La expresión del ARNm del RL ha sido identificada en las células humanas de la granulosa, tecaes e intersticiales, en varios tejidos de rata y en el ovario porcino. La proteína de la leptina ha sido encontrada en el líquido folicular en concentraciones que se corresponden con aquellas encontradas en el suero y las concentraciones de leptina en sangre periférica varían durante el ciclo menstrual. Se ha demostrado que la leptina inhibe la síntesis de estradiol estimulada por el aumento de FSH mediado por IGF-1 en células de la granulosa de ratas, ovejas y humanos (Agarwal *et al.*, 1999), e inhibe la síntesis de andrógenos en las células tecaes bovinas, estimulada por LH. En estudios recientes se ha demostrado que la administración in vivo de leptina a ratas inmaduras con priming de gonadotropina y la exposición in vitro de ovarios de rata perfundidos a concentraciones elevadas de leptina puede llevar a una marcada disminución de ovocitos ovulados. Además, en medio de cultivo de embriones, la leptina promovió el desarrollo de embriones que se encontraban es estadio de dos células a blastocistos, blastocistos expandidos y blastocistos eclosionados (Kawamura *et al.*, 2002, Swain *et al.*, 2004). Sin embargo, la exposición de ovocitos porcinos u ovinos a la leptina durante la maduración in vitro y posterior cultivo de embriones después de la fertilización in vitro resultó en la formación de menos blastocistos en comparación con los controles. Tanto la isoforma larga (OB-Rb) como la isoforma corta (OB-Ra) del RL se expresan en la células de Leydig lo cual indica un efecto potencial de la leptina sobre la función testicular. Por otra parte, la leptina inhibe la secreción de testosterona estimulada por la gonadotropina coriónica humana en explantes de testículos de rata (Caprio *et al.*, 1999).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **Localización**

El trabajo se llevó a cabo en el Centro de Investigación y Producción (CIP) Quimsachata, de la Estación Experimental Illpa, Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria (INIEA) – Puno, Perú. La estación se ubica a una altitud de 4,200 m.s.n.m., en el distrito de Santa Lucía, provincia de Lampa, departamento de Puno, a 15°04' de latitud sur y 70°18' de longitud oeste, que corresponden a la zona agroecológica de puna seca, piso altitudinal sub alpino, cuyo clima es de tipo semi – seco frío, siendo la temperatura media de 7 °C (máxima 18 °C y mínima –13 °C) con 485 mm de precipitación pluvial anual. El trabajo se realizó en el mes de noviembre del año 2005 en el inicio de la estación de lluvias.

#### **Animales**

Se utilizaron 36 alpacas hembras adultas mayores de tres años, no gestantes, sin cría al pie y con por lo menos un parto en su historial reproductivo de un rebaño de 300 animales.

## **Diseño experimental**

### **Manejo de los animales**

Las 36 alpacas fueron seleccionadas al azar y distribuidas en dos grupos: G1 = 18 alpacas con condición corporal < de 3.0, y G2 = 18 alpacas con condición corporal > de 3.0. Todos los animales seleccionados se encontraron bajo las mismas condiciones de manejo, que consistía en un pastoreo extensivo diario en la vegetación natural, la cual está conformada mayoritariamente por gramíneas, ciperáceas, juncáceas y leguminosas. La salida de los animales a la zona de pastoreo se iniciaba a las 6 am, y el retorno al corral de encierro era alrededor de las 5 a 6 pm, con un período de ayuno en el encierro de 12 hrs. aprox.

### **Determinación de la condición corporal**

A todos los animales se les midió la condición corporal, la cual se determinó en base a una observación subjetiva, de acuerdo a la escala de 1 – 5, donde 1: emaciada y 5: obesa (Huanca *et al.*, 1998; Bertot, *et al.*, 2000). La técnica consistió en la palpación de la zona lumbar, pelviana, base del cuello y base de la cola; determinándose posteriormente que las dos primeras (zona lumbar y pelviana) eran las más apropiadas, debido a que en éstas se detectaban mayores diferencias del estado nutricional.

### **Toma de muestra**

La toma de muestra se realizó a las 8 am., con los animales en ayuno, antes de que salgan a pastoreo. Las 36 alpacas seleccionadas fueron contenidas físicamente y se les colectó 5 a 7 ml de sangre por punción de la vena yugular, luego las muestras fueron centrifugadas a 4000 rpm por espacio de 7 minutos. Fue obtenido en promedio 2 ml. de suero por muestra, las que fueron almacenadas en viales previamente etiquetados y luego mantenidas en congelación a – 20 °C hasta su análisis.



## Determinación de leptina

Todas las muestras fueron analizadas para determinar su concentración de leptina, utilizando la técnica de radioinmunoensayo (RIA) específico para ovinos descrito por Delavaud *et al.* (2000). El procedimiento fue realizado en el Laboratorio de Veterinaria del Centro de Investigaciones Nucleares (CIN), Facultad de Ciencias, Universidad de la República – Montevideo, Uruguay. El RIA es de doble anticuerpo y utiliza leptina recombinante ovina con 98 % de pureza de acuerdo a SDS-PAGE, y marcada con  $I^{125}$ . El anticuerpo es producido en conejos. El RIA utilizado ha sido validado en humanos, en varias especies domésticas tales como: ovinos, bovinos, caprinos, llamas, pollos, ratas, ratones y perros, y en algunas especies silvestres tales como: ciervo elk (*Cervus elaphus*), reno (*Rangifer tarandus*), alce (*Alces alces*), elefante africano (*Loxodonta africana*) y elefante marino del sur (*Mirounga leonina*); en algunos casos utilizando suero sanguíneo, plasma sanguíneo, leche y líquido céfalo raquídeo; observándose en todos los casos buenas curvas de paralelismo (DH. Keisler, Comunicación personal; Guilherme *et al.*, 2004). Antes de analizar las muestras se corrieron las correspondientes curvas de paralelismo para suero de alpaca. Todas las muestras fueron analizadas utilizando un solo ensayo por triplicado. El límite de detección fue 0.1 ng/ml y el coeficiente de variación intraensayo fue de 10 %.

El procedimiento se realizó como sigue: se prepararon concentraciones normales de leptina recombinante ovina para cada curva estándar (1 µg/ml) diluida en buffer/glicerol y mantenidas a – 80 °C. Se agregaron estándares triplicados (0.0833, 0.125, 0.25, 0.4, 0.75, 2.0, 2.5 y 4 ng/tubo) en un volumen de 50 µl. Para los tubos de las muestras, se aplicaron alícuotas dobles de 100 µl de suero. Los tubos de las muestras y los estándares fueron incubados por 24 horas a 4 °C con 50 µl de una dilución de trabajo de 1:1500 de antisuero de leptina ovina (Ac 7137, diluido en buffer conteniendo 1:100 de suero de conejo), para lograr un volumen total de 400 µl en el buffer de incubación. Después de la incubación inicial, se agregó a cada tubo 100 µl de  $I^{125}$ -leptina ovina y la incubación continuó por 20 horas adicionales a 4 °C. La dilución final del antisuero de leptina fue 1:15000. Los ligandos unidos y libres fueron separados agregando 100 µl de un plasma ovino anti-conejo que fue diluido 1:5 en suero equino para las curvas normales o 1:5 en buffer de incubación para las muestras de suero desconocidas. La adición del suero

equino se hizo para igualar el volumen de la proteína en todos los tubos (estándares y muestras) al final del procedimiento de precipitación del doble-anticuerpo que fue dejado a temperatura ambiente por 1 hora. La precipitación de los complejos antígeno-anticuerpo se completó agregando 2.0 ml de polietilenglicol al 4.4% y centrifugando inmediatamente a 3000 rpm, por 25 min y a 4 °C. El I<sup>125</sup>-leptina ovina suelto fue removido por aspiración del sobrenadante. La radioactividad restante en el precipitado fue medida en el contador gamma.

### **Análisis estadístico**

Se utilizó la prueba de t de Student de Independencia para analizar la diferencia entre la media de los valores de leptina entre G1 y G2. El nivel de significancia empleado para el análisis de los resultados fue de 5 %. Los resultados se presentan como media  $\pm$  error estándar de la media. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el paquete estadístico GraphPad Prism<sup>®</sup> 3.0 (GraphPad Software, 1999).

#### IV. RESULTADOS

La media general de la concentración de leptina fue de **17.23 ± 0.81 ng/ml**. Los resultados de acuerdo a la condición corporal se presentan en el Cuadro 2.

**Cuadro 2. Valores séricos de leptina en alpacas con condición corporal (CC) < 3.0 y CC > 3.0.**

Grupos	Valores séricos de leptina (en ng/ml)
G1: alpacas con CC < 3.0 (n = 18)	18.14 ± 1.12
G2: alpacas con CC > 3.0 (n = 18)	16.32 ± 1.15

La concentración de leptina no fue afectada por la categorización de los animales por condición corporal < a 3.0 o mayor > a 3.0. Las hembras con condición corporal > 3.0 presentaron valores de concentración de leptina 10 % más bajos que las hembras con inferior condición corporal, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa, según la prueba de t de Student ( $p = 0.2653$ ).

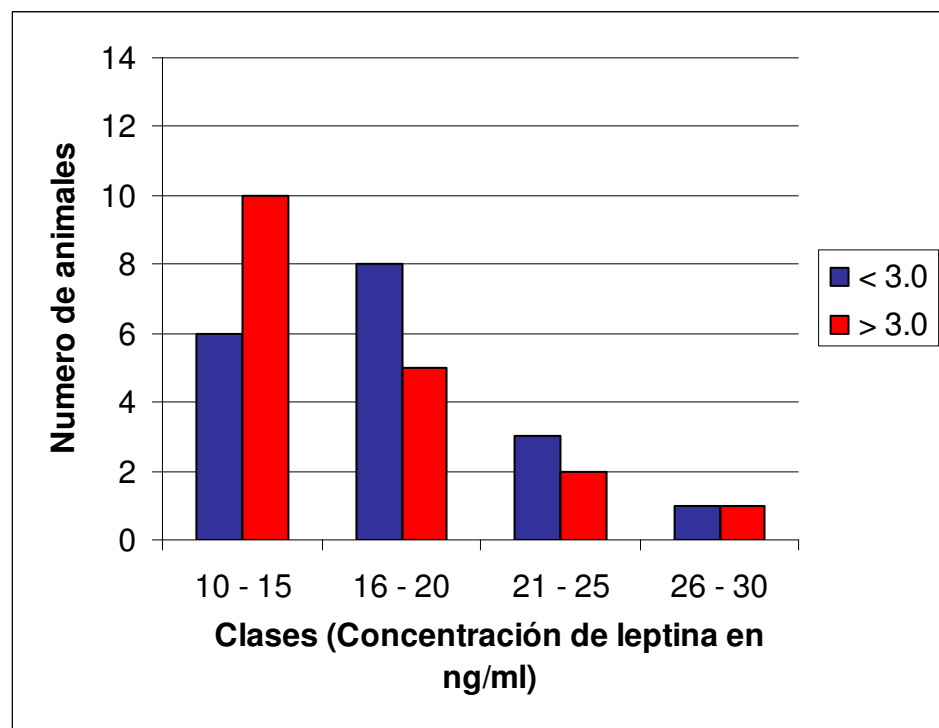
Los valores extremos de la concentración de leptina en general fueron de 10.17 ng/ml (mínimo) a 28.39 ng/ml (máximo), no observándose diferencia entre los mínimos y máximos para G1 y G2, tal como se observa en el Cuadro 3. Asimismo, las clases de

los valores de leptina se distribuyeron sin mostrar diferencias significativas entre ambos grupos (Figura 2).

**Cuadro 3. Valores séricos mínimos y máximos de leptina en G1 y G2.**

	Valor mínimo	Valor máximo
G1: alpacas con CC < 3.0	10.17 ng/ml	26.74 ng/ml
G2: alpacas con CC > 3.0	10.48 ng/ml	28.39 ng/ml

**Figura 2. Distribución de las clases de concentración de leptina en G1 (CC < 3.0) y G2 (CC > 3.0).**



## V. DISCUSIÓN

Esta es la primera vez que se obtienen datos de valores séricos de leptina en alpacas, lo que permite confirmar la presencia de la hormona en ésta especie de camélido y disponer de una estimación de sus valores por la técnica de RIA. La literatura internacional señala que la leptina se encuentra presente en muchos vertebrados estudiados, especialmente mamíferos y aves (Friedman y Halaas, 1998; Dridi *et al.*, 2000) e incluso reptiles (Paolucci *et al.*, 2001; Lewis, 2000); sin embargo, no se había evidenciado su presencia en alpacas.

Los valores de la concentración de leptina varían de acuerdo a la técnica que se emplea para su determinación. Se han desarrollado diferentes protocolos para la medición de leptina; aquellos que emplean la técnica de RIA, y los que usan la técnica de inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA) (Kauter *et al.*, 2000; Chow y Phoon, 2003; Hardie *et al.*, 1996). En ambas técnicas se obtiene una buena sensibilidad y especificidad a leptina, siendo el RIA la técnica con mayor difusión.

En el caso del método de RIA, existe un kit comercial llamado “multiespecie” (XL-85K, Linco Research, St. Louis, MO, Estados Unidos), y RIA específicos no comerciales desarrollados para cada especie, como por ejemplo ovinos (Delavaud *et al.*, 2000), bovinos (Delavaud *et al.*, 2002; Ehrhardt *et al.*, 2005) y pollos (Dridi *et al.*, 2000). Sin embargo, el kit comercial de RIA multiespecie parece subestimar las concentraciones de leptina cuando se compara con los RIA específicos; por ejemplo, en el caso de ovinos y bovinos, con el RIA multiespecie se obtuvieron valores de  $2.36 \pm 0.87$  ng/ml y 2.2 ng/ml versus  $7.48 \pm 3.32$  ng/ml y 6.6 ng/ml cuantificado con el RIA específico respectivamente (Delavaud *et al.*, 2000; Delavaud *et al.*, 2002). En tal

sentido, al haber utilizado un RIA específico para rumiantes, el valor obtenido como media general para alpacas en el presente trabajo sería representativo:  $17.23 \pm 0.81$  ng/ml, además, es importante resaltar que los valores de leptina en alpacas son en promedio mucho más altos que los observados en otros rumiantes domésticos adultos, siendo la cabra la única especie que presenta valores de leptina superiores a los 10 ng/ml (Bonnet *et al.*, 2005).

La literatura menciona que la concentración de leptina varía de acuerdo a la edad, como ha sido demostrado en diferentes especies domésticas como caballos (Buff *et al.*, 2002), bovinos (Blum *et al.*, 2005; Strauch *et al.*, 2003) y ovinos (Čebulj-Kadunc y Cestnik, 2005), y en humanos (Lönnerdal y Havel, 2000; Chow y Phoon, 2003); existiendo diferencias entre individuos muy jóvenes y adultos. No se podría determinar si este factor ha influido en los resultados del presente trabajo de acuerdo a edad, dado que las hembras elegidas eran todas adultas (mayores de 3 años, hasta 9 años de edad); en tal sentido sería necesario determinar los niveles de leptina en alpacas menores de dos o mayores de 10 años.

Los niveles de leptina están correlacionados positivamente con la condición corporal (CC) y el contenido graso (Delavaud *et al.*, 2000; Block *et al.*, 2001; Buff *et al.*, 2002; Gentry *et al.*, 2002). En el presente trabajo no fue medida esta correlación dado que la categorización por CC no fue estimada en forma individual. Cabe resaltar que en las alpacas no son evidentes los diferentes grados de CC como ocurre en otras especies domésticas, sin embargo, en el caso de llamas recientemente se está intentando estandarizar la técnica de CC (Rigalt *et al.*, 2006). En el caso de las alpacas, con la alimentación a base pasturas naturales los animales tienden a mantener una uniformidad en la condición corporal.

Los trabajos que estudian la correlación entre la leptina y la condición corporal utilizan un rango que puede ser amplio: 1 – 9 en el caso de equinos (Buff *et al.*, 2002; Gentry *et al.*, 2002), mientras que para el caso de ovinos, el rango de CC es de: 1 – 5 (Delavaud *et al.*, 2000), categorización referencial que es similar a la empleada en el presente trabajo.

La falta de diferencias en las concentraciones de leptina en alpacas con  $CC \leq 3.0$  o  $\geq 3.1$ , observada en el presente estudio puede obedecer a diferentes causas. Todos los animales se encontraban sometidos al mismo manejo: pastoreo desde las 7 hrs. hasta las

17 o 18 hrs. cuando son confinados en los corrales. Las muestras fueron tomadas a las 8 hrs., es decir con 14 a 15 horas de ayuno, y dado el trabajo en cerdas, realizado por Barb *et al.* (2001) en el cual se observó la disminución de los valores de leptina en ayunos superiores a 28 horas, se podría descartar el ayuno como un factor influyente. Sin embargo, una explicación posible sea no haber utilizado condiciones corporales extremas, así como la falta de amplitud en los rangos extremos de condición corporal, al haber utilizado sólo dos valores. De hecho, los valores mínimos y máximos obtenidos en alpacas con CC < 3.0 y > 3.0 son similares (mínimos: 10.17 ng/ml y 10.48 ng/ml y máximos 26.74 ng/ml y 28.39 ng/ml, respectivamente). Es decir en ambos grupos la concentración de leptina varió alrededor de 62 a 63 %.

Los primeros estudios sobre la medición de la leptina fueron realizados en ratones y posteriormente en humanos, y en ambos se encontró que los individuos obesos presentaban mayores niveles circulantes de la hormona. En el caso de los rumiantes domésticos y equinos, los trabajos realizados nos indican que a mayor nivel de condición corporal, la concentración de leptina es ligeramente más elevada (Chilliard *et al.*, 2005; Buff *et al.*, 2002). En el caso de alpacas, en el presente trabajo no fueron observadas diferencias en la concentración de leptina debido a que no se encontraron animales con condiciones corporales extremas (obesos), ya que existe una uniformidad en la CC dadas la condiciones de manejo y alimentación.

## **VI. CONCLUSIONES**

- Los resultados obtenidos permiten confirmar la presencia de la hormona leptina en alpacas hembras adultas vacías.
- Los niveles séricos de leptina en alpacas obtenidos en el presente estudio son más elevados en relación a otros rumiantes domésticos adultos.
- Bajo las condiciones del presente estudio, no se observaron diferencias en la concentración de leptina en alpacas con condición corporal  $< 3.0$  y  $> 3.0$ .



## **VII. RECOMENDACIONES**

- Se requiere realizar estudios con una mayor cantidad de animales, incluyendo los de condición corporal extrema o con diferentes grados de condición corporal.
- Se recomienda estudiar los niveles de leptina en alpacas hembras con sobrealimentación y restricción alimenticia.
- Es necesario el estudio de los valores de leptina en alpacas hembras de otros grupos etáreos.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA CITADA

**Adam, CL.; JJ. Robinson. 1994.** The role of nutrition and photoperiod in the timing of puberty. *Proceedings of the Nutrition Society.* 53:89-102.

**Adams, GP. 1997.** Pregnancy diagnosis in the llama. En: *Youngquist, RS.* (Ed.) *Current therapy in large animal theriogenology.* WB. Saunders, Philadelphia - Estados Unidos. pp:808-812.

**Agarwal. SK.; K. Vogel; SR. Weitsman; DA. Magoffin. 1999.** Leptin antagonizes the Insuline-like growth factor-I augmentation of steroidogenesis in granulose and theca cells of the human ovary. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 84:1072-1076.

**Ahima, RS.; J. Dushay; SN. Flier; D. Prabakaran; JS. Flier. 1997.** Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *Journal of Clinical Investigation.* 99:391-395.

**Amstalden, M.; MR. García; RL. Stanko; SE. Niezielski; CD. Morrison; DH. Keisler; GL. Williams. 2002.** Central infusion of recombinant ovine leptin normalizes plasma insulin and stimulates a novel hypersecretion of luteinizing hormone after short-term fasting in mature beef cows. *Biology of Reproduction.* 66:1555-1561.

**Amstalden, M.; MR. García; SW. Williams; RL. Stanko; SE. Nizielski; CD. Morrison; DH. Keisler; GL. Williams. 2000.** Leptin gene expression, circulating leptin, and luteinizing hormone pulsatility are acutely responsive to short-term fasting in prepubertal heifers: relationships to circulating insulin and insulin-like growth factor I. *Biology of Reproduction.* 63:127-133.

**Amstalden, M. 2003.** Role of leptin in regulate the bovine hypothalamic-gonadotropic axis. PhD Thesis. Texas A&M University, Texas - Estados Unidos. 208pp.

**Araujo, O. 2002.** Recientes avances en nutrición de rumiantes. Memorias XI Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal. 22 – 26 Octubre. Valera. Venezuela. 9p.

**Bado, A.; S. Levasseur; S. Attoub; S. Kermorgant; JP. Laigneau; MN. Bortoluzzi ; L. Moizo; T. Lehy; M. Guerre-Millo; Y. Le Marchand-Brustel; MJM. Lewin. 1998.** The stomach is a source of leptin. *Nature*. 394:790-793.

**Barash, IA.; CC. Cheung; DS. Weigle; H. Ren; EB. Kabigting; JL. Kuijper; DK. Klifton; RA. Steiner. 1996.** Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology*. 137:3144-3147.

**Barb, CR. 1999.** The brain-pituitary-adipocyte axis: Role of leptin in modulating neuroendocrine function. *Journal of Animal Science*. 77:1249-1257.

**Barb, CR.; JB. Barret; RR. Kraeling; GB. Rampacek. 2001.** Serum leptin concentrations, luteinizing hormone and growth hormone secretion during feed and metabolic fuel restriction in the prepuberal gilt. *Domestic Animal Endocrinology*. 20:47-63.

**Barb, CR.; X. Yan; MJ. Azain; RR. Kraeling; GB. Rampacek; TG. Ramsay TG. 1998.** Recombinant porcine leptin reduces feed intake and stimulates growth hormone secretion in swine. *Domestic Animal Endocrinology*. 15:77-86.

**Bertot, JA.; A. Vázquez; R. Avilés; R. Vázquez. 1999.** Relación entre los cambios de la condición corporal y la fertilidad postparto en vacas mestizas Holstein x Cebú. *Revista de Producción Animal (Cuba)*. 12:103-106.

**Bjorbæk, C.; S. Uotani; B. da Silva; JS. Flier. 1997.** Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 272:32686-32695.

**Block, SS.; WR. Butler; RA. Ehrhardt; AW. Bell; ME. Van Amburg; YR. Boisclair. 2001.** Decreased concentration of plasma leptin in periparturient dairy cows is caused by negative energy balance. *Journal of Endocrinology*. 171:339-348.

**Blum, JW.; Y. Zbinden; HM. Hammon; Y. Chilliard. 2005.** Plasma leptin status in young calves: effects of pre-term birth, age, glucocorticoid status, suckling, and feeding with and automatic feeder or by bucket. *Domestic Animal Endocrinology*. 28:119-133.

**Bonnet, M.; C. Delavaud; J. Rouel; Y. Chilliard. 2005.** Pregnancy increases plasma leptin in nulliparous but not primiparous goats while lactation depresses it. *Domestic Animal Endocrinology*. 28:216-223.

**Bravo, PW.; GH. Stabenfeldt; BL. Lasley; ME. Fowler. 1991.** The effect of ovarian follicle size on pituitary and ovarian responses to copulation in domesticated South American camelids. *Biology of Reproduction*. 45:553-559.

**Bravo, PW.; J. Sumar. 1989.** Laparoscopic examination of the ovarian activity in alpacas. *Animal reproduction Science*. 21:271-281.

**Bravo, PW.; ME. Fowler; BL. Lasley. 1994.** The postpartum llama: Fertility after parturition. *Biology of Reproduction*. 51:1084-1087.

**Bruce, SM. 2004.** Serum leptin concentrations varies with meal size and feeding frequency. MS Thesis. Texas A&M University, Texas - Estados Unidos. 83pp.

**Buff, PR.; AC. Dodds; CD. Morrison; NC. Whitley; EL. McFadin; JA. Daniel; J. Djiane; DH. Keisler. 2002.** Leptin in horses: Tissue localization and relationship between peripheral concentrations of leptin and body condition. *Journal of Animal Science*. 80:2942-2948.

**Butler, WR. 2005.** Relationships of negative energy balance with fertility. *Advances in Dairy Technology*. 17:35-46.

**Cabrera, V. 2000.** Concentraciones de leptina y prolactina bioactiva e inmunorreactiva durante el ciclo menstrual normal. *Revista Cubana de Endocrinología*. 11:143-152.

**Campfield, LA.; FJ. Smith; Y. Guisez; R. Devos; P. Burn. 1995.** Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*. 269:546-549.

**Caprio, M.; AM. Isidori; AR. Carta; C. Moretti; ML. Dufau; A. Fabbri. 1999.** Expression of functional leptin receptors in rodent Leydig cells. *Endocrinology*. 140:4939-4947.

**Čebulj-Kadunc, N.; V. Cestnik. 2005.** Circulating leptin concentrations in Lipizzan horses and Jezersko-Solchava sheep. *Slovenian Veterinary Research*. 42(1-2):11-14.

**Ciccioli, NH.; RP. Wettemann; LJ. Spicer; CA. Lents; FJ. White; DH. Keisler. 2003.** Influence of body condition at calving and postpartum nutrition on endocrine function and reproductive performance of primiparous beef cows. *Journal of Animal Science*. 81:3107-3120.

**Chehab, F.; K. Mounzih; R. Lu; ME. Lim. 1997.** Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. *Science*. 275:88-90.

**Cheung, CC.; DK. Clifton; RA. Steiner. 1997a.** Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology*. 138:4489-4492.

**Cheung, CC.; JH. Thornton; JL. Kuijper; DS. Weigle; DK. Clifton; RA. Steiner. 1997b.** Leptin as a metabolic gate for the onset of puberty in the female rat. *Endocrinology*. 138:855-858.

**Cheung, CC.; JE. Thornton; SD. Nurani; DK. Clifton; RA. Steiner. 2001.** A reassessment of leptin's role in triggering the onset of puberty in the rat and mouse. *Neuroendocrinology*. 74:12-21.

**Chilliard, Y.; C. Delavaud; M. Bonnet. 2005.** Leptin expression in ruminants : Nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. *Domestic Animal Endocrinology*. 29:3-22.

**Chow, VTK; MC. Phoon. 2003.** Measurement of serum leptin concentrations in university undergraduates by competitive ELISA reveals correlations with body mass index and sex. *Advances in Physiology Education*. 27:70-77.

**Consejo Nacional de Camélidos Sudamericanos (CONACS), 2006.** Camélidos sudamericanos. CONACS, Ministerio de Agricultura. Lima - Perú. (Online) Disponible en: <http://www.conacs.gob.pe/cs.htm> [15/05/06]

**Coleman, DL. 1973.** Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia*. 9:294-298.

**Coleman, DL.; KP. Hummel. 1973.** The influence of genetic background on the expression of the obese (*ob*) gene in the mouse. *Diabetologia* 9:287-293.

**Correia, MLG.; WG. Haynes; K. Rahmouni; DA. Morgan; WI. Sivit ; AL. Mark. 2002.** The concept of leptin selective resistance, evidence from agouti yellow obese mice. *Diabetes*. 51:439-442.

**Daniel, JA.; BK. Whitlock; JA. Baker; B. Steele; CD. Morrison; DH. Keisler; JL. Sartin. 2002.** Effect of body fat mass and nutritional status on 24-hour leptin profiles in ewes. *Journal of Animal Science*. 80:1083-1089.

**Del Campo, MR.; CH. Del Campo; OJ. Ginther. 1996.** Vascular provisions for a local utero-ovarian cross-over pathway in New World camelids. *Theriogenology*. 46:983-991.

**Delavaud, C.; F. Bocquier; Y. Chilliard, DH. Keisler; A. Gertler. 2000.** Plasma leptin determination in ruminants: effect of nutritional status and body fatness on plasma leptin concentration assessed by a specific RIA in sheep. *Journal of Endocrinology*. 165:519-526.

**Delavaud, C.; A. Ferlay; Y. Faulconnier; F. Bocquier; G. Kann; Y. Chilliard. 2002.** Plasma leptin concentration in adult cattle: Effects of breed, adiposity, feeding level, and meal intake. *Journal of Animal Science*. 80:1317-1328.

**Dirlwanger, M.; V. di Vetta; E. Guenat; P. Battilana; G. Seematter; P. Schneiter; E. Jéquier; L. Tappy. 2000.** Effects of short-term carbohydrate or fat over feeding on energy expenditure and plasma leptin concentrations in healthy female subjects. *International Journal of Obesity*. 24:1413-1418.

**Dyer, CJ.; JM. Simmons; RL. Matteri; DH. Keisler. 1997.** Leptin receptor mRNA is expressed in ewe anterior pituitary and adipose tissues and is differentially expressed in hypothalamic regions of well-fed and feed-restricted ewes. *Domestic Animal Endocrinology*. 14:119-128.

**Dridi, S.; J. Williams; V. Bruggeman; M. Onagbesan; N. Raver; E. Decuypere; J. Djiane; A. Gertler; M. Taouis. 2000.** A chicken leptin-specific radioimmunoassay. *Domestic Animal Endocrinology*. 18:325-335.

**Ehrhardt RA.; RM. Slepatis; J. Siegal-Willott; ME. van Amburgh; AW. Bell; YR. Boisclair. 2000.** Development of a specific radioimmunoassay to measure physiological changes of circulating leptin in cattle and sheep. *Journal of Endocrinology*. 166:519-528.

**Elimam, A.; C. Marcus. 2002.** Meal timing, fasting and glucocorticoids interplay in serum leptin concentrations and diurnal profile. *European Journal of Endocrinology*. 147:181-188.

**Elmqvist JK.; RS. Ahima; E. Maratos-Flier; JS. Flier; CB. Saper. 1997.** Leptin activates neurons in ventrobasal hypothalamus and brainstem. *Endocrinology*. 138:839-842.

**Fernández Baca, S. 1971.** La alpaca: reproducción y crianza. Boletín de Divulgación N°7. Centro de Investigación IVITA. UNMSM. Lima - Perú. 43p.

**Fernández Baca, S. 1993.** Manipulation of reproductive functions in male and female new world camelids. *Animal Reproduction Science*. 33:307-323.

**Fernández Baca, S.; DHL. Madden; C. Novoa. 1970a.** Effect of different mating stimuli on induction of ovulation in the alpaca. *Journal of Reproduction and Fertility*. 22:261-267.

**Fernández Baca, S.; J. Sumar; C. Novoa; V. Leyva. 1973.** Relación entre la ubicación del cuerpo lúteo y la localización del embrión en la alpaca. *Revista de Investigaciones Pecuarias (IVITA)*. 2:131-135.

**Fernández Baca, S.; W. Hansel; C. Novoa. 1970b.** Embryonic mortality in the alpaca. *Biology of Reproduction*. 3:243-251.

**Fernández Baca, S.; W. Hansel; R. Saatman; J. Sumar; C. Novoa. 1979.** Differential luteolytic effects of right and left uterine horns in the alpaca. *Biology of Reproduction*. 20:586-595.

**Finn, PD.; M. Cunningham; KYF. Pau; HG. Spies; DK. Clifton; RA. Steiner. 1998.** The stimulatory effect of leptin on the neuroendocrine reproductive axis of the monkey. *Endocrinology*. 139:4652-4662.

**Flores, E.; V. Guevara; C. Gomez. 1989.** Avances en investigaciones en alpacas. Reporte Técnico 103, SRCRSP. Lima, Perú. 11p.

**Friedman, JM.; JL. Halaas. 1998.** Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 395:763-770.

**Fundación para la Innovación Agraria (FIA), 2000.** Camélidos en Chile. Situación actual y perspectivas. FIA, Ministerio de Agricultura. Santiago - Chile. 130p.

**García, MR.; M. Amstalden; CD. Morrison; DH. Keisler; GL. Williams. 2003.** Age at puberty, total fat and conjugated linoleic acid content of carcass, and circulating metabolic hormones in beef heifers fed a diet high in linoleic acid beginning at four month of age. *Journal of Animal Science*. 81:261-268.

**García, MR.; M. Amstalden; DH. Keisler; N. Raver; A. Gertler; GL. Williams. 2002a.** Leptin attenuates the central effects of neuropeptide-Y on somatotropin but not gonadotropin secretion in cows. *Journal of Animal Science*. 80: Suppl. 1:352.

**Garcia, MR.; M. Amstalden; SW. Williams; RL. Stanko; CD. Morrison; DH. Keisler; SE. Nizielski; GL. Williams. 2002b.** Serum leptin and its adipose gene expression during pubertal development, the estrous cycle, and different seasons in cattle. *Journal of Animal Science*. 80:2158-2167.

**Gazal, OS.; LS. Leshin; RL. Stanko; MG. Thomas; DH. Keisler; LL. Anderson; GL. Williams. 1998.** Gonadotropin-releasing hormone secretion into third-ventricle cerebrospinal fluid of cattle: Correspondence with the tonic and surge release of luteinizing hormone and its tonic inhibition by suckling and neuropeptide Y. *Biology of Reproduction*. 59:676-683.

**Gentry, LR.; DL. Thompson; GT. Gentry; KA. Davis; RA. Godke; JA. Cartmill. 2002.** The relationship between body condition, leptin, and reproductive and hormonal characteristics of mares during seasonal anovulatory period. *Journal of Animal Science*. 80:2695-2703.

**Guilherme, C.; A. Bianchini; PE. Martinez; RB. Robaldo; EP. Colares. 2004.** Serum leptin concentration during the terrestrial phase of the Southern elephant seal *Mirounga leonina* (Carnivora: Phocidae). *General and Comparative Endocrinology*. 139:137-142.

**González, RR.; C. Simón, P. Caballero-Campo; R. Norman; D. Chardonens; L. Devoto; P. Bischof. 2000.** Leptin and reproduction. *Human Reproduction Update*. 6:290-300.

**Halaas, JL.; KS. Gajiwala; M. Maffei; SL. Cohen; BT. Chait; D. Raboniwitz; RL. Lallone; SK. Burley; JM. Friedman. 1995.** Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*. 269:543-546.

**Hardie, LJ.; D. Vernon Rayner; S. Holmes; P. Trayhurn. 1996.** Circulating leptin levels are modulated by fasting, cold exposure, and insulin administration in lean but not Zucker (*fa/fa*) rats as measured by ELISA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 223:660-665.



**van Heek M.; DS. Compton; CF. France; RP. Tedesco; AB. Fawzi; MP. Graziano; EJ. Sybertz; CD. Strader; HR. Davis. 1997.** Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. *Journal of Clinical Investigation*. 99:385-390.

**Henry, BA.; JW. Goding; WS. Alexander; AJ. Tilbrook; BJ. Canny; F. Dunshea; A. Rao; A. Mansell; IJ. Clarke. 1999.** Central administration of leptin to ovariectomized ewes inhibits food intake without affecting the secretion of hormones from the pituitary gland: evidence for a dissociation of effects on appetite and neuroendocrine function. *Endocrinology*. 140:1175-182.

**Hoggard, N.; L. Hunter; JS. Duncan; LM. Williams; P. Trayhurn; JG. Mercer. 1997.** Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 94:11073-11078.

**Houseknecht, KL.; CA. Baile; RL. Matteri; ME. Spurlock. 1998.** The biology of leptin: A review. *Journal of Animal Science*. 76:1405-1420.

**Houseknecht, KL.; CP. Portocarrero. 1998.** Leptin and its receptors: Regulators of whole-body energy homeostasis. *Domestic Animal Endocrinology*. 15:457-475.

**Huanca, W.; J. Camacho; A. Cordero; A. Ampuero; B. Santiago; C. Quiñónez. 1998.** Evaluación clínica testicular y biometría de alpacas machos en la sierra central. *Resúmenes XXI Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal*. Puno, Perú. pp:167-169.

**Huwasquiche, A. 1974.** Balance de nitrógeno y digestibilidad en alpacas y ovinos. Tesis Prog. Acad. Med. Vet. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

**Hube, F.; U. Lietz; M. Igel ; PB. Jensen; H. Tornqvist; HG. Joost; H. Hauner. 1996.** Difference in leptin mRNA levels between omental and subcutaneous abdominal adipose tissue from obese humans. *Hormone and Metabolic Research*. 28:690-693.

**Iqbal, J.; S. Pompolo; RV. Considine; IJ. Clarke. 2000.** Localization of leptin receptor-like immunoreactivity in the corticotropes, somatotropes and gonadotropes in the ovine anterior pituitary. *Endocrinology*. 141:1515-1520.

**Iqbal, J.; S. Pompolo; T. Murakami; E. Grouzmann; T. Sakurai; B. Meister; IJ. Clarke. 2001.** Immunohistochemical characterization of localization of long-form leptin receptor (OB-Rb) in neurochemically defined cells in the ovine hypothalamus. *Brain Research*. 920:55-64.

**Kauter, K.; M. Ball; P. Kearney; R. Tellam; JR. McFarlane. 2000.** Adrenaline, insulin, and glucagon do no have acute effects on plasma leptin levels in sheep: developmental and characterization of an ovine leptin ELISA. *Journal of Endocrinology*. 166:127-135.

**Kawamura, K.; N. Sato; J. Fukuda; H. Kodama; J. Kumagai; H. Tanikawa; A. Nakamura; T. Tanaka. 2002.** Leptin promotes the development of mouse preimplantation embryos *in vitro*. *Endocrinology*. 143:1922-1931.

**Knigth, TW.; M. Ridland; I. Scott; AF. Death; TK. Wyeth. 1995.** Foetal mortality at different stages of gestation in alpacas (*Lama pacos*) and the associated changes in progesterone concentrations. *Animal Reproduction Science*. 40:89-97.

**Lewis, R. 2000.** Leptin lizards. Hormone's discovery in reptiles suggests role in energy allocation. *The Scientist*. 14(3):20.

**Lönnerdal, B.; PJ. Havel. 2000.** Seum leptin concentrations in infants: effect of diet, sex, and adiposity. *American Journal of Clinical Nutrition*. 72:484-489.

**Lucy, MC.; J. Beck; CR. Staples; HH. Head; RL. De La Sota; WW. Thatcher. 1992.** Follicular dynamics, plasma metabolites, hormones and insuline-like growth factor I (IGF-I) in lactating cows with positive or negative energy balance during the preovulatory period. *Reproduction Nutrition Development*. 32:331-341.

**Maciel, MN.; DA. Zieba; M. Amstalden; DH. Keisler; J. Neves; GL. Williams. 2004.** Leptin prevents fasting-mediated reductions in pulsatile secretion of luteinizing hormone and enhances is GnRH-mediated release in peripubertal heifers. *Biology of Reproduction*. 70:229-235.

**Magni, P.; R. Vettor; C. Pagano; A. Calcagno; E. Beretta; E. Messi; M. Zanisi; L. Martini; M. Motta. 1999.** Expression of leptin receptor in immortalized gonadotropin-releasing hormone-secreting neurons. *Endocrinology*. 140:1581-1585.

**Margetic, S.; C. Gazzola; GG. Pegg; RA. Hill. 2002.** Leptin: A review of its peripheral actions and interactions. *International Journal of Obesity*. 26:1407-1433.

**Martin, GB.; SW. Walkden-Brown. 1995.** Nutritional influences on reproduction in mature male sheep and goats. *Journal of Reproduction and Fertility, Supplement* 49:437-449.

**McShane, TM.; SL. Petersen; S. McCrone; DH. Keisler. 1993.** Influence of food restriction on neuropeptide-Y, proopiomelanocortin, and luteinizing hormone-releasing hormone gene expression in sheep hypothalami. *Biology of Reproduction*. 49:831-839.

**McShane, TM.; T. May; JL. Miner; DH. Keisler. 1992.** Central actions of neuropeptide-Y may provide a neuromodulatory link between nutrition and reproduction. *Biology of Reproduction*. 46:1151-1157.

**Montague, CT.; JB. Prins; L. Sanders; JE. Digby; S. O'Rahilly. 1997.** Depot- and sex-specific differences in human leptin mRNA expression: implications for the control of regional fat distribution. *Diabetes*. 46:342-347

**Mooradian, AD; R. Hurd; J. Chehade; K. Pun; M. Haas. 2000.** Age-related changes in plasma leptin binding activity in rats: a comparison of a simple acid-ethanol precipitation technique with column chromatography. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 224:273-277.

**Morash, B.; A. Li; PR. Murphy; M. Wilkinson; E. Ur. 1999.** Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. *Endocrinology*. 140:5995-5998.

**Moschos, S.; JL. Chan; CS. Mantzoros. 2002.** Leptin and reproduction: A review. *Fertility and Sterility*. 77:433-444.

**Mounzih, K.; R. Lu; F. Chehab. 1997.** Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese *ob/ob* males. *Endocrinology*. 138:1190-1193.

**Nagatani, S.; Y. Zeng; DH. Keisler; DL. Foster; CA. Jaffe. 2000.** Leptin regulates pulsatile luteinizing hormone and growth hormone secretion in the sheep. *Endocrinology*. 141:3965-3975.

**Novoa, C. 1970.** Reproduction in camelidae: Review. *Journal of Reproduction and Fertility*. 22:3-20.

**Novoa, C. 1991.** Fisiología de la reproducción en la hembra. En: *Fernández Baca, S.* (Ed.) *Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos*. FAO. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Santiago - Chile. pp: 91-109.

**Novoa, C.; S. Fernández Baca; J. Sumar; V. Leyva. 1972.** Pubertad en la alpaca. *Revista de Investigaciones Pecuarias (IVITA)*. 1:29-35.

**Novoa, C.; V. Leyva. 1996.** Reproducción de alpacas y llamas. Publicación Científica IVITA N°26. 13p.

**Ovesjö, M-L.; M. Gamstedt; M. Collin, B. Meister. 2001.** GABAergic nature of hypothalamic leptin target neurons in the ventromedial arcuate nucleus. *Journal of Neuroendocrinology*. 13:505-516.

**Paolucci, M.; M. Rocco; E. Varricchio. 2001.** Leptin presence in plasma, liver and fat bodies in the lizard *Podarcis sicula*. Fluctuations throughout the reproductive cycle. *Life Sciences*. 69:2399-2408.

**Pelleymounter, MA.; MJ. Cullen; MB. Baker; R. Hecht; D. Winters. 1995.** Effects of obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*. 269:540-543.

**Pollard, JC.; RP. Littlejohn, GH. Moore. 1995.** Seasonal and other factors affecting the sexual behavior of alpacas. *Animal Reproduction Science*. 37:349-356.

**Qian, H; CR. Barb; MM. Compton; GJ. Hausman; MJ. Azain; RR. Kraeling; CA. Baile. 1999.** Leptin mRNA expression and serum leptin concentrations as influenced by age, weight, and estradiol in pigs. *Domestic Animal Endocrinology*. 16:135-143.

**Rigalt, F.; C. Ferrando; R. Pivotto; C. Krapp; R. Gomez. 2006.** Ajuste de la técnica de determinación de nota de condición corporal (NCC) en llamas (*Lama glama*). Resúmenes IV Congreso Mundial sobre Camélidos. 11 – 15 Octubre. Santa María, Argentina. 4p.

**Robinson, JJ. 1990.** Nutrition in the reproduction of farm animals. *Nutrition Research Reviews*. 3:253-276.

**Sahu, A. 1998.** Leptin decreases food intake induced by melanin-concentrating hormone (MCH), Galanin (GAL) and neuropeptide Y (NPY) in the rat. *Endocrinology*. 139:4739-4742.

**San Martín, F. 1996.** Nutrición de camélidos sudamericanos y su relación con la reproducción. *Revista Argentina de Producción Animal*. 16:305-312.

**Satoh N.; Y. Ogawa; G. Katsuura; T. Tsuji; H. Masuzaki; J. Hiraoka; T. Okazaki; M. Tamaki; M. Hayase; Y. Yoshimasa; S. Nishi; K. Hosoda; K. Nakao. 1997.** Pathophysiological significance of the *Obese* gene product, Leptin, in ventromedial hypothalamus (VMH)-Lesioned rats: Evidence for loss of its satiety effect in VMH-lesioned rats. *Endocrinology*. 138:947-954.

**San Martín M.; M. Copaira; J. Zúñiga; R. Rodríguez; G. Bustinza; L. Acosta. 1968.** Aspects of reproduction in the alpaca. *Journal of Reproduction and Fertility*. 16:395-399.

**Schmidt CR. 1973.** Breeding season and notes on some others aspects of reproduction in captive camelids. *International Zoo Yearbook*. 13:387-390.

**Schwartz, MW.; RJ. Seeley; LA. Campfield; P. Burn; DG. Baskin. 1996.** Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *Journal of Clinical Investigation*. 98:1101-1106.

**Stephens, TW.; M. Basinski; PK. Bristow; JM. Bue-Valleskey; SG. Burgett; L. Craft; J. Hale; J. Hoffmann; HM. Hsiung; A. Kriauciunas; W. MacKellar; PR. Rosteck; B. Schoner; D. Smith; FC. Tinsley; X. Zhang; M. Heiman. 1995.** The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the *obese* gene product. *Nature*. 377:530-532.

**Strauch, TA.; DA. Neuendorff; CG. Brown; ML. Wade; AW. Lewis; DH. Keisler; RD. Randel. 2003.** Effects of lasalocid on circulating concentrations of leptin and insulin-like growth factor-I and reproductive performance of postpartum Brahman cows. *Journal of Animal Science*. 81:1363-1370.

**Sumar, J. 1997.** Avances y perspectivas en reproducción de camélidos. *Memorias I Symposium Internacional Avances en Reproducción de Rumiantes*. 17-18 de Julio. Lima, Perú. pp:30-55.

**Sumar, J.; PW. Bravo; WC. Foote. 1993.** Sexual receptivity and time of ovulation in alpacas. *Small Ruminant Research*. 11:143-150.

**Sumar, JB. 1996.** Reproduction in llamas and alpacas. *Animal Reproduction Science*. 42:405-415.

**Sumar, JB. 2002.** Llamas y alpacas. En: *Hafez, ESE.; B. Hafez*. (Eds). *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 7ª ed. Ed. McGraw-Hill Interamericana. México DF. pp: 224-242.

**Susin, I.; SC. Loerch; KE. McClure; ML. Day. 1995.** Effects of limit feeding a high-grain diet on puberty and reproductive performance of ewes. *Journal of Animal Science*. 73:3206-3215.

**Swain, JE.; RL. Dunn; D. McConnell; J. Gonzalez-Martinez; GD. Smith. 2004.** Direct effects of leptin on mouse reproductive function: Regulation of follicular oocyte, and embryo development. *Biology of Reproduction*. 71:1446-1452.

**Tartaglia, LA. 1997.** The leptin receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 272:6093-6096.

**Thornton, JE.; CC. Cheung, DK. Clifton; RA. Steiner. 1997.** Regulation of hypothalamic proopiomelanocortin mRNA by leptin in *ob/ob* mice. *Endocrinology*. 138:5063-5066.

**Tokuda, T.; C. Delavaud; Y. Chilliard. 2003.** Plasma leptin concentration in pre- and post-weaning lambs. *Animal Science*. 76:221-227.

**Vaughan, JL.; KL. Macmillan, MJ. D'Occhio. 2004.** Ovarian follicular wave characteristics in alpacas. *Animal Reproduction Science*. 80:353-361.

**Wade, GN.; JE. Schneider; HY. Li. 1996.** Control of fertility by metabolic cues. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. 270:E1-E19.

**Wang, J; R. Liu; M. Hawkins; N. Barzilai; L. Rossetti. 1998.** A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature*. 393:684-688.

**Wiesner, G.; M. Vaz; G. Collier; D. Seals; D. Kaye; G. Jennings; G. Lambert; D. Wilkinson; M. Esler. 1999.** Leptin is released from the human brain: Influence of adiposity and gender. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 84:2270-2274.

**Wilson, BD.; D. Bagnol; CB. Kaelin; MM. Ollmann, I. Bantz; SJ. Watson; GS. Barsh. 1999.** Physiological and anatomical circuitry between Agouti-related protein and leptin signaling. *Endocrinology*. 140:2387-2397.

**Woller, M.; S. Tessmer; D. Neff; AA. Nguema; B. Van Roo; D. Waechter-Brulla. 2001.** Leptin stimulates gonadotropin releasing hormone release from cultured intact hemihypothalamic and enzymatically dispersed neurons. *Experimental Biology and Medicine*. 226:591-596.

**Wheeler, JC. 1995.** Evolution and present situation of the South American camelidae. *Biological Journal of the Linnean Society*. 54:271-295.

***Yu, WH.; M. Kimura; A. Walczewska; S. Karanth; SM. McCann. 1997.*** Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* 94:1023-1028.

***Zhang, Y.; R. Proenca; M. Maffei; M. Barone; L. Leopold; JM. Friedman. 1994.*** Positional cloning of the mouse *obese* gene and its human homologue. *Nature.* 372:425-432.

***Zieba, DA.; M. Amstalden; MN. Maciel; DH. Keisler; N. Raver; A. Gertler; GL. Williams. 2003.*** Divergent effects of leptin on luteinizing hormone and insulin secretion are dose dependent. *Experimental Biology and Medicine.* 228:325-330.

***Zieba, DA.; M. Amstalden; S. Morton; MN. Maciel; DH. Keisler; GL. Williams. 2004.*** Regulatory roles of leptin at the hypothalamic-hypophyseal axis before and after sexual maturation in cattle. *Biology of Reproduction.* 71:804-812.

## IX. APÉNDICE

### Apéndice 1. Valores generales de leptina en alpacas adultas (en ng/ml).

Identificación del Animal	Valor de Leptina ng/ml
023113	10.970
3660299	10.165
204103	15.770
355202	24.555
381203	18.980
028103	13.980
101198	19.050
117198	17.325
024103	11.725
007103	16.860
288298	19.600
351203	21.180
S/N	26.740
164201	20.350
000348	24.665
C001	19.570
C006	14.180
C007	20.815
464313	12.860
368203	16.185
438302	13.350
0440100	16.675
290201	15.730
181103	28.395
1900199	25.365
463303	21.350
168203	10.475
251202	12.175
061102	13.380
246213	15.545
265202	11.740
436203	16.925
207298	10.970
C002	19.835
C004	14.120
C003	18.665
<b>MEDIA</b>	17.23
<b>D.S.</b>	4.84
<b>E.E.M.</b>	0.81



**Apéndice 2. Valores de leptina en dos grupos alpacas adultas según condición corporal.**

<b>ALPACAS MAYORES DE 3 AÑOS</b>					
<b>Grupo 1 Condición Corporal &lt; 3.0</b>			<b>Grupo 2 Condición Corporal &gt; 3.0</b>		
<b>NÚMERO</b>	<b>C.C.</b>	<b>ng/ml</b>	<b>NÚMERO</b>	<b>C.C.</b>	<b>ng/ml</b>
023113	< 3.0	10.970	464313	> 3.0	12.860
3660299	< 3.0	10.165	368203	> 3.0	16.185
204103	< 3.0	15.770	438302	> 3.0	13.350
355202	< 3.0	24.555	0440100	> 3.0	16.675
381203	< 3.0	18.980	290201	> 3.0	15.730
028103	< 3.0	13.980	181103	> 3.0	28.395
101198	< 3.0	19.050	1900199	> 3.0	25.365
117198	< 3.0	17.325	463303	> 3.0	21.350
024103	< 3.0	11.725	168203	> 3.0	10.475
007103	< 3.0	16.860	251202	> 3.0	12.175
288298	< 3.0	19.600	061102	> 3.0	13.380
351203	< 3.0	21.180	246213	> 3.0	15.545
S/N	< 3.0	26.740	265202	> 3.0	11.740
164201	< 3.0	20.350	436203	> 3.0	16.925
000348	< 3.0	24.665	207298	> 3.0	10.970
C001	< 3.0	19.570	C002	> 3.0	19.835
C006	< 3.0	14.180	C004	> 3.0	14.120
C007	< 3.0	20.815	C003	> 3.0	18.665
<b>Media</b>		18.14	<b>Media</b>		16.32
<b>D.S.</b>		4.74	<b>D.S.</b>		4.90
<b>E.E.M.</b>		1.12	<b>E.E.M.</b>		1.15

### Apéndice 3. Prueba de t de Student de Independencia utilizada.

#### PRUEBA DE T DE STUDENT

##### Table Analyzed

##### Data Table-1 Groups < 3.0 and > 3.0

##### Unpaired t test

P value	0.2653
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=1.133 df=34

##### How big is the difference?

Mean $\pm$ SEM of $\leq 3.0$	18.14 $\pm$ 1.117 N=18
Mean $\pm$ SEM of $\geq 3.1$	16.32 $\pm$ 1.154 N=18
Difference between means	1.819 $\pm$ 1.606
95% confidence interval	-5.085 to 1.447
R squared	0.03636

##### F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.067, 17, 17
P value	0.4473
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

